

DOCKET NO.: 204060US

09/763864
JP Rec'd PCT/PTO 28 FEB 2001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Masahide SATO, et al

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/04355

INTERNATIONAL FILING DATE: 30 JUNE 2000

FOR: METHOD OF MAKING FERMENTATION PRODUCT

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

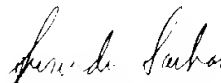
In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
JAPAN	11/186117	30 JUNE 1999

A certified copy of the corresponding Convention application(s) was submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP00/04355**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)



JP00/4355
日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

30.06.00

REC'D 18 AUG 2000

WIPO

PCT

EU
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月30日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第186117号

出 願 人

Applicant (s):

サッポロビール株式会社

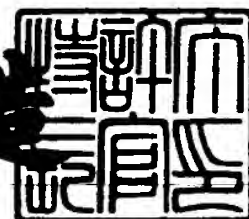
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3060361

【書類名】 特許願
 【整理番号】 P99XX-022
 【提出日】 平成11年 6月30日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12C 11/00
 【発明者】

【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当日 1 0 番地 サッポロビール株式会社
 醸造技術研究所内

【氏名】 佐藤 雅英

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当日 1 0 番地 サッポロビール株式会社
 醸造技術研究所内

【氏名】 梅本 進午

【特許出願人】

【識別番号】 000002196

【氏名又は名称】 サッポロビール株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088155

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100089978

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】

【識別番号】 100092657

【弁理士】

【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【選任した代理人】

【識別番号】 100107191

【弁理士】

【氏名又は名称】 長濱 範明

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発酵生産物の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法において、前記微生物として非凝集性酵母を用いることを特徴とする発酵生産物の製造法。

【請求項2】 前記非凝集性酵母として以下の条件（a）を満たすものを用いることを特徴とする請求項1に記載の方法。

（a）酵母0.6gを20mlの水道水に添加して得られる酵母懸濁液に、該酵母懸濁液9mlに対して1mlの1500ppmのカルシウムイオンを含むpH4.5の0.5M酢酸緩衝液を加え、全体を均一に攪拌して室温にて5分間静置した後に、肉眼にて酵母の凝集・沈降が認められないこと。

【請求項3】 前記バイオリアクターとして、固定化微生物が内部に配置された流動層部と、前記流動層部の下流側から発酵液の一部を抜き出して該流動層部の上流側に戻す液循環部とを備えた流動層型リアクターを用いることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 前記流動層部の下流側から発酵液の一部を抜き出して該流動層部の上流側に戻すことにより流動層を形成させつつ発酵を行い、得られた発酵生産物を前記リアクターから取り出すと共に該リアクターに新たな原料液を供給して前記発酵を反復実施することを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記固定化微生物として、非凝集性酵母をキトサン系固定化用担体に固定化したものを用いることを特徴とする請求項1～4のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】 前記非凝集性酵母が非凝集性酒類酵母であり、前記発酵生産物が酒類であることを特徴とする請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】 前記非凝集性酵母が非凝集性ビール酵母であり、前記発酵生産物が麦芽アルコール飲料であることを特徴とする請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】 請求項 1～7 のうちのいずれか一項に記載の方法により製造されたものであることを特徴とする麦芽アルコール飲料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発酵生産物の製造法に関し、より詳しくは、固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

バイオテクノロジーの発展により、麦芽アルコール飲料（ビール及び麦芽を用いた発泡酒）、ワイン、清酒、酢、醤油等の醸造分野において固定化微生物を利用したバイオリアクターによる発酵生産物の製造が検討されており、このようにバイオリアクターを用いることによって、

1) 高濃度の酵母を固定化して発酵を行なうため醸造が速く終了し、醸造期間の短縮が可能となり、それに伴って製造タンクの本数及び建設費の低減が可能となる、

2) 連続発酵が可能となるため酵母の投入・回収が不要となる、
といったことが期待されている。

【0003】

しかしながら、バイオリアクターを用いてビール等を製造した場合、従来は、伝統的な回分式の発酵法で製造した製品に比べて製品中のアミノ酸やジアセチル（DA）の量が多く、エステルの量が少なくなり、結果としてバイオリアクターを用いて得た製品は香味上の欠点があるという問題があり、バイオリアクターを主発酵に用いた場合に特に顕著であった。

【0004】

そのため、このような問題の解決を図るべく従来から研究がなされており、特開平 7-123969 号公報には流動層型リアクターを用いた連続発酵法において発酵液を循環させる方法が開示されている。しかしながら、この方法によって

も発酵過程におけるアミノ酸の消費は改善されるものの、若臭・未熟臭の原因となるジアセチルの量の低減は十分ではなく、得られる製品は未だ香味上改良の余地を有するものであった。また、この方法を含むバイオリアクターでの製造方法に関しては、主発酵終了時における浮遊酵母数が一般的に低く、また発酵過程における発酵速度が不安定となり、それらの制御が困難であるという課題も有していた。

【0005】

ところで、ビール等の発酵生産物を製造するための酵母としては、従来からある程度の凝集性を有することが必要であると認識されていた。すなわち、凝集性とは発酵終了時に酵母が集まって塊となって液から分かれて浮上又は沈降する性質をいい、凝集性が高すぎると早い時期に凝集が起こり、発酵液と酵母の接触が断たれて発酵不十分となり、他方、凝集性が低すぎるといつまでも酵母が液中に浮遊しているため酵母の回収量が低減し、遠心分離等による酵母の分離、回収が必要となる等の無駄な手間と時間がかかる。そのため、従来は、発酵生産物の製造にはある程度の凝集性を有する酵母（凝集性酵母）を使用することが常識とされており、前述の特開平7-123969号公報に記載の方法においてもこのような凝集性酵母が使用されていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、固定化微生物を利用したバイオリアクターによって発酵生産物を製造するにあたって、発酵過程における発酵速度を一定に保つと共に、発酵終了時における浮遊酵母数を従来のものよりも高い水準に安定して維持することができ、これにより特に麦芽アルコール飲料をバイオリアクターによって製造する場合には、発酵液並びに最終製品中のジアセチルの量を十分に低減する等して、最終製品の香味を改善することが可能な方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、固定化微生物を

利用したバイオリアクターを用いる場合においては、酵母を分離・回収する必要がないことから従来の認識に反して非凝集性の酵母を用いることができ、それによって発酵過程における発酵速度が一定となり、発酵終了時における浮遊酵母数が後発酵にとってより好ましい水準に安定して維持されるようになり、特に麦芽アルコール飲料の主発酵にかかるバイオリアクターを用いる場合においては発酵液並びに最終製品中のジアセチルの量が十分に低減される等して製品の香味が向上するという事を見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明の発酵生産物の製造法は、固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法において、前記微生物として非凝集性酵母を用いることを特徴とする方法である。

【0009】

また、本発明の麦芽アルコール飲料は、前記本発明の方法により製造されたものであることを特徴とするものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0011】

本発明は、固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法であり、前記微生物として非凝集性酵母を用いる。

【0012】

先ず、本発明にかかる酵母及びその固定化担体について説明する。本発明において使用される酵母は、後述するように非凝集性である酵母であればよく、対象とする発酵生産物に応じた酵母の中から非凝集性のものが選択される。例えば、酒類の製造に用いる酵母としては、醸造原料液を代謝してアルコールや炭酸ガス等を産生するいわゆる酒類酵母の中から非凝集性のものが選択され、具体的にはサッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム等の中から非凝集性のものが選択される。このような非凝集性の酒類酵母としては非凝集性ビール酵母

、非凝集性ワイン酵母、非凝集性清酒酵母等が挙げられ、例えば非凝集性ビール酵母を用いてビール、発泡酒といった麦芽アルコール飲料を製造することができる。

【0013】

ここで、凝集性とは、発酵過程において分散していた酵母が集合して細胞表面で付着・結合して塊（フロック）を形成する性質をいう。通常のビール製造に用いられる下面発酵酵母では、発酵液中で細胞が凝集して塊を形成して液中から速やかに分離し易い特性を持った株と、凝集しにくく比較的長い期間分散・浮遊する特性を持った株とがあり、前者を「凝集性酵母」、後者を「非凝集性酵母（塵状酵母ともいう）」という。

【0014】

このような酵母の凝集性は、本質的には酵母自身の持つ遺伝的特性で、サッカロミセス・セレビシエの第VIII染色体に相当する位置に存在するLg-FLO1遺伝子によって制御されるということが報告されているが（特開平8-266287号公報）、醸造用水、原料、麦汁組成、麦汁通気条件、酵母の培養条件、発酵容器、酵母の取り扱い等によっても影響されたり、発酵経過の時期によって凝集性の強さが変化していくこともある。このように酵母株によっても凝集性には強弱があり、同じ種類の酵母でも株の差によって非凝集性のものと凝集性のものとがあるため、本発明においては下記の方法等によって非凝集性の株を選択し、その株に由来した非凝集性酵母を使用することが好ましく、かかる非凝集性酵母のみを使用することが特に好ましい。

【0015】

このように酵母の凝集性を測定して本発明の方法に使用する非凝集性酵母を選択する方法としては、YEAST GENETICS: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS, 205-224 (1983)に記載の方法等があり、具体的には以下の方法が好ましい。

【0016】

すなわち、酵母（発酵終了時に3000×g、10分間の遠心分離により沈澱分離された酵母）0.6gを20mlの水道水に添加して得られる酵母懸濁液に、この酵母懸濁液9mlに対して1mlの1500ppmのカルシウムイオンを含むpH4.5の0.5M酢酸緩衝

液を加え、手で上下に振とうする等して全体を均一に攪拌して室温にて 5 分間静置する。

【0 0 1 7】

そして、凝集の程度を目視（肉眼）にて観察し、以下の基準：

0：非凝集性（肉眼にて液と塊の境界が確認されず、酵母の凝集・沈降が認められない）

1：弱い凝集性（肉眼にて液と塊の境界は確認できないが、一部の酵母の凝集・沈降が認められる）

2：並みの凝集性（肉眼にて液と塊の境界が確認でき、酵母の凝集・沈降が認められる）

3：強い凝集性（殆ど完全に酵母が凝集・沈降し、上清も殆ど完全に清澄となる）

にしたがって 4 段階に判定する。本発明においては、上記判定基準における非凝集性（レベル 0）の条件を満たす非凝集性の株を選択し、その株に由来した非凝集性酵母を使用することが好ましく、かかる非凝集性酵母のみを使用することが特に好ましい。

【0 0 1 8】

このように本発明の方法においては従来の認識に反して非凝集性株に由来した非凝集性酵母を使用することにより、発酵過程において酵母がバイオリアクター容器内に凝集して沈降・堆積することが十分に防止され、それによって発酵速度が一定に保たれると共に、主発酵終了時における浮遊酵母数が従来の凝集性酵母を用いる場合に比べて高い水準に安定して維持される。また、特に麦芽アルコール飲料の主発酵に本発明の方法を採用する場合においては、主発酵終了時の浮遊酵母数向上により主発酵終了時の発酵液中のジアセチル量が十分に低減され、更には後発酵でジアセチルが一層効率よく還元されて最終製品中のジアセチル量が十分に低減され、かかる未熟臭成分の減少によって製品の香味が向上する。

【0 0 1 9】

上記非凝集性酵母を固定化する担体としては、特に制限されず各種のものが使用できるが、特にキチン・キトサン、アルギン酸、カラギーナンからなる担体が

好ましく、とりわけキトサン系ビーズ（キトサンのアセチル化により得られるキチン・キトサンを原料とする担体）が好ましい。キトサン系ビーズは親水性で多孔質であるため炭酸ガスの排出が容易となり、その上摩耗しにくく、密度が原料液に近いために流動性も良好となる。更に、キトサン系ビーズは保持できる微生物量が多いため、キトサン系ビーズによれば発酵時間をより短縮できる傾向にあり、しかも微生物が比較的緩やかに吸着固定化されるため増殖や離脱が容易となり、包括担体のように死菌体が担体内に存在し続けることも回避される。

【0020】

このような担体に非凝集性酵母を固定化するに先だって行われる殺菌の方法は任意であり、高圧滅菌法、苛性ソーダによる殺菌法、蒸気による殺菌法等が好ましい。また、担体に非凝集性酵母を固定化する方法も特に制限されず、例えば酵母懸濁液に担体を加えて攪拌あるいは液を循環させる方法が挙げられるが、その他の公知の方法であってもよい。

【0021】

次に、本発明にかかるバイオリアクターについて説明する。本発明にかかるバイオリアクターは内部に前記固定化微生物（担体に固定化された非凝集性酵母）が配置され、その内部で原料液と固定化微生物とが接触して発酵が行なわれるものである。このようなバイオリアクターとしては、その形式から完全混合槽型リアクター、充填層型リアクター、膜型リアクター、流動層型リアクター、横形リアクター等が挙げられるが、麦芽アルコール飲料の主発酵のように醸造用原料の代謝によってアルコールと炭酸ガスが生成される発酵にはガスを系外に排出するのが容易な流動層型リアクターが好ましい。

【0022】

このような流動層型リアクターとしては、固定化微生物が内部に配置された流動層部と、流動層部の下流側から発酵液の一部を抜き出して流動層部の上流側に戻す液循環部とを備えたものが好ましく、図1に本発明に好適な流動層型リアクターの一例の概略模式図を示す。

【0023】

図1に示す流動層型リアクター1は、反応タンク2及び液循環部3を備えてお

り、反応タンク 2 はその上流側から順に整流部 4、流動層部 5、空筒部 6 により構成されており、反応タンク 2 の下流側端部にはガス排出部 7 が設けられている。そして、液循環部 3 は流動層部 5 の下流側及び流動層部 5 の上流側（図 1 では整流部 4）に接続された配管 3 1 とポンプ 3 2 及びバルブ 3 3 とから構成されており、更に配管 3 1 は途中で分岐してバルブ 3 4 を介して生産物タンク 8 に接続されている。また、反応タンク 2 の上流側端部には、原料液タンク 9 がポンプ 9 1 を有する配管 9 2 によって接続されている。

【0024】

流動層部 5 は、微生物を固定化した担体を内部に配置してある部分であり、液循環部 3 は、反応タンク 2 に供給された発酵液（原料液）の一部を流動層部 5 の下流側から抜き出して再び反応タンク 2 の流動層部 5 の上流側に戻す部分である。図 1 に示すリアクター 1 においては、抜き出された発酵液（原料液）は整流部 4 から反応タンク 2 内に戻され、導入された液の流れがここで整えられる。また、空筒部 6 は、発酵中に生じる炭酸ガスと発酵液とを気液分離する部分であり、具体的には液面から反応タンク 2 上部のガス排出部 7 までの部分である。そして、空筒部 6 で分離された炭酸ガス等の気体はガス排出部 7 から容器外に排出される。

【0025】

図 1 に示す流動層型リアクター 1 においては、微生物を固定化した担体を流動層部 5 に配置し、原料液を原料液タンク 9 からポンプ 9 1 を用いて整流部 4 に供給して発酵を行なう。そして、発酵液（原料液）の一部を液循環部 3 のポンプ 3 2 を用いて流動層部 5 の下流側から抜き出し、再び反応タンク 2 の流動層部 5 の上流側（図 1 では整流部 4）に戻して循環させることにより流動層を形成させつつ発酵させる。発酵中に生成した炭酸ガスは、発酵液を循環させていること等によって流動層内に滞留することなく、空筒部 6 を経てガス排気部 7 より容器外に排出される。なお、発酵中の液空塔速度（流動層単位体積あたりの流体の線速度）は、微生物を固定化した担体の密度によって変動させることができるが、1～20cm/min が好ましく、1～12cm/min がより好ましい。

【0026】

図 1 に示す流動層型リアクター 1 においては、発酵が終了した後、発酵生産物を含む発酵終了液をリアクター 1 からポンプ 32 及びバルブ 34 を用いて生産物タンク 8 に取り出すと共に、リアクター 1 に原料液タンク 9 からポンプ 91 を用いて新たな原料液を供給して前記の発酵を反復実施することが好ましい。すなわち、発酵が終了した後、循環を停止して発酵終了液をリアクター 1 外に抜き出すと同時に、又はその直後に、リアクター 1 に新たな原料液を供給することによって、前記の発酵を反復して行なわせる。

【0027】

なお、リアクター 1 の運転方法は、回分式、反復回分式、連続式のいずれも可能であるが、より良好な香味を有する製品を短時間で得るためには反復回分式の発酵が好適である。発酵中に微生物の増殖と更新が行なわれ、また菌体の生理状態や増殖周期及びリアクター 1 内の菌体分布等が伝統的な酒類の製造方法である回分式操作に類似しているため、反復回分式によれば香味がより良好になる傾向にある。

【0028】

発酵生産物を製造するための原料としては、使用する非凝集性酵母による発酵に適したものであればよく、既知のものを任意に使用することができる。例えば、酒類の製造には、通常は麦汁、果汁、糖液、穀類糖化液等が単独で、もしくは適宜混合して用いられる。その他、必要に応じて適当な栄養分等を加えてもよい。

【0029】

また、発酵条件については基本的には既知の条件と変わらず、例えば発酵温度としては麦芽アルコール飲料醸造の場合は通常 15℃以下、好ましくは 8～10℃であり、ワイン醸造の場合は通常 20℃以下、好ましくは 15～20℃である。

【0030】

本発明の方法で製造可能な発酵生産物としては、麦芽アルコール飲料、ワイン、清酒、酢、醤油等の様々な醸造分野における生産物が挙げられるが、麦芽アルコール飲料、ワイン、清酒等の酒類が好適であり、中でも本発明によれば香味が

向上することからビール、発泡酒等の麦芽アルコール飲料がより好ましい。

【0031】

【実施例】

以下、実施例及び比較例により本発明の内容をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0032】

なお、以下の実施例及び比較例では、実際に製造現場で用いたビール酵母（サッカロミセス・セレピシエ等）から前述の方法及び基準によって選別した凝集性株（A-1, A-2）及び非凝集性株（NA-1, NA-2, NA-3, NA-4, NA-5）を使用した。それらの凝集性を判定した結果を表1に示す。また、参考として、NCYC（National Collection of Yeast Cultures（英国））におけるタイプカルチャーNCYC-No.203及びNCYC-No.985についても同様に凝集性を判定した結果を表1に示す。

【0033】

【表1】

ビール酵母の凝集性判定結果		
	酵 母	判定結果
作業酵母	A-1	2
	A-2	2
	NA-1	0
	NA-2	0
	NA-3	0
	NA-4	0
	NA-5	0
タイプカルチャー	NCYC-No.203	2
	NCYC-No.985	0

【0034】

実施例1～2及び比較例1

図1に示す流動層型バイオリアクター（全容積：180ml）を用い、以下の諸条件の下で主発酵工程を前述の繰り返し回分発酵形式（反復回分式）で行った

。そして、得られた発酵液について後述する浮遊酵母数試験を実施した。

【0035】

〔主発酵条件〕

担体 : キトサン系ビーズ (富士紡績社製、キトパールHP)、

スケール : 担体50ml、麦汁量100ml、

使用菌株 : A-1 (比較例1)、NA-1 (実施例1)、NA-2 (実施例2)、

酵母固定化法 : 常法に従い循環しながら2日間担体と接触させて固定化 (担体50mlに対して泥状酵母2.4g)、

流速 : 約1ml/分、

発酵温度 : 8℃一定、

発酵時間 : 48時間/回、

継続発酵回数 : 10回 (回分発酵)、

使用麦汁 : 糖度11%Platoに調整した麦汁。

【0036】

(浮遊酵母数試験)

各回の主発酵終了後、発酵液中の浮遊酵母数をトーマの血球計算盤を用いて測定した。得られた結果を表2及び図2に示す。なお、繰り返し発酵の最初の数回は、担体中酵母の馴養期間に相当することから、測定の対象から外した (以下同様)。

【0037】

表2及び図2に示した結果から明らかなように、この条件で非凝集性株を用いた場合は発酵終了時の浮遊酵母数が2~4千万cells/mlと通常の発酵の場合により近い高い水準に安定して維持された。一方、凝集性株を用いた場合は発酵後半で酵母が担体上部に沈降する様子が観察され、発酵終了時の浮遊酵母数が7回目の発酵までは1千万cells/ml以下であった。

【0038】

なお、10回の継続発酵終了後に担体中の酵母数を測定したところ、3株とも 10^9 cells/担体1ml当り程度であり、非凝集性株においても凝集性株と同様に

主発酵用バイオリアクターとしての実用に耐え得る固定化酵母数が達成されたことが確認された。また、担体に固定化されている酵母の様子を電子顕微鏡にて確認したところ、非凝集性株も凝集性株と同様にキトサン系ビーズ担体中に十分に固定化されていることが確認された。更に、10回の継続発酵終了後に担体内外の死細胞率を調べたところ、3株とも10%以下で問題はなかった。

【0039】

【表2】

発酵回数	主発酵終了時の浮遊酵母数(単位: $\times 10^6$ cells/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	平均値
NA-1	35	32	33	44	30	36	42	36.0
NA-2	26	32	32	34	14	25	22	26.4
A-1	5	7	9	5	8	7	11	7.4

【0040】

実施例3～4及び比較例2

図1に示す流動層型バイオリアクター（全容積：20リットル）を用い、以下の諸条件の下で主発酵工程を前述の繰り返し回分発酵形式（反復回分式）で行った。そして、得られた発酵液について後述する発酵性試験、浮遊酵母数試験、ジアセチル生成量試験を実施した。

【0041】

〔主発酵条件〕

担体：キトサン系ビーズ（富士紡績社製、キトパールHP）、

スケール：担体6L、麦汁量 8L

使用菌株：A-2（比較例2）、NA-3（実施例3）、NA-4（実施例4））、

酵母固定化法：常法に従い循環しながら2日間担体と接触させて固定化（担体6Lに対して泥状酵母650g）、

液空塔速度：6～12 cm/min、

発酵温度：8℃一定、

発酵時間：48時間／回、

継続発酵回数：7回（回分発酵）、

使用麦汁：糖度11%Platoに調整した麦汁。

【0042】

（発酵性試験）

各回の主発酵過程においては、発酵速度比較の指標として発酵開始24時間のエクス消費量を振動式密度計（アントンパール社製、DMA58）により測定した値を使用した。得られた結果を表3及び図3に示す。

【0043】

表3及び図3に示した結果から明らかなように、非凝集性株を用いた場合は発酵速度は1回目以降でほぼ一定の値に収束した（約6.7%/24hr）。また、主発酵はほぼ2日間で終了した。なお、非凝集性株を用いた場合は、酵母がリアクターの中に堆積する様子は観察されなかった。

【0044】

一方、凝集性株を用いた場合は凝集・沈降した酵母がリアクター容器内に堆積し、発酵に関与する酵母量が増加して発酵速度が速くなる傾向にあり、発酵速度は一定しなかった。なお、凝集性株を用いた場合における発酵3回目が2回目よりも発酵速度が緩やかになっているが、これはその間に短時間の麦汁交換により堆積した酵母を取り除いたためである。このように凝集性株を使用した場合はその発酵速度の制御に難があり、発酵速度を安定化させるためには堆積酵母の除去といった処理を行なう必要があった。

【0045】

【表 3】

	発酵開始24時間のエキス消費量(%)				
発酵回数	1	2	3	4	平均値
NA-3	6.4	7.0	7.2	6.8	6.8
NA-4	5.9	6.7	6.8	6.6	6.5
A-2*1	8.2	9.6	8.1	8.5	8.6

* 1: A-2は、2,3 回目の間で麦汁により
カラム内を洗浄し、発酵速度を制御した。

【0046】

(浮遊酵母数試験)

各回の主発酵終了後、発酵液中の浮遊酵母数を実施例 1 と同様の方法で測定した。得られた結果を表 4 及び図 4 に示す。

【0047】

表 4 及び図 4 に示した結果から明らかなように、非凝集性株を用いた場合は発酵終了時の浮遊酵母数が NA-3 については 2.3~3.9 千万 cells/ml、NA-4 については 1.8~3.3 千万 cells/ml と高い水準に安定して維持された。一方、凝集性株を用いた場合は 0.5~3.1 千万 cells/ml であり、反復回分発酵の後半で酵母がリアクター内に堆積し、その影響によって主発酵終了時の浮遊酵母数の変動が激しいことが認められた。

【0048】

【表 4】

	主発酵終了時浮遊酵母数(10^6 cells/ml)				
発酵回数	1	2	3	4	平均値
NA-3	24	23	39	28	28.5
NA-4	29	33	30	18	27.5
A-2	5	12	25	31	18.3

【0049】

(ジアセチル生成量試験)

各回の主発酵終了後、発酵液中のジアセチル(DA)の生成量をガスクロマトグラフィー(島津製作所社製、GC-14B)により測定した。得られた結果を表5及び図5に示す。

【0050】

表5及び図5に示した結果から明らかなように、非凝集性株を用いた場合は主発酵終了時のジアセチル生成量が0.3~0.6ppmと低い水準に安定して維持された。一方、凝集性株を用いた場合は0.4~1.3ppmであり、ジアセチルの生成量は非凝集性株では凝集性株の半分程度でかつ低い水準に安定して維持されることが明らかになった。

【0051】

【表5】

発酵回数	主発酵終了時DA生成量 (ppm)							平均値 *2
	1	2	3	4	5	6	7	
NA-3	0.42	0.36	0.36	0.33	0.60	0.38	0.41	0.41
NA-4	0.55	0.49	0.39	0.42	0.37	0.44	0.42	0.44
A-2	0.53	0.42	0.98	0.49	1.27	0.90	0.78	0.77

* 2 : 通常レベル: 約0.4 ppm

【0052】

実施例5

図1に示す流動層型バイオリアクター(全容積: 450リットル)を用い、以下の諸条件の下で主発酵工程を前述の繰り返し回分発酵形式(反復回分式)で行った。そして、得られた発酵液について前述と同様の方法により発酵性試験、浮遊酵母数試験、ジアセチル生成量試験を実施した。更に、本実施例では、最終製品の香味成分試験及び官能試験も実施した。

【0053】

〔主発酵条件〕

担体 : キトサン系ビーズ(富士紡績社製、キトパールHP)、

スケール：担体120L、麦汁量170L、

使用菌株：N A - 5 (非凝集性株)、

酵母固定化法：実施例 3、4 と同様に、常法に従い担体120Lに対して泥状酵母約13kgを循環しながら固定化した、

液空塔速度：6 ~ 12 cm/min、

発酵温度：8℃一定、

発酵時間：4 8 時間/回、

継続発酵回数：9 回 (回分発酵)、

使用麦汁：糖度11%Platoに調整した麦汁。

【0 0 5 4】

[後発酵条件]

スケール：30L、

期間：4週間、

後発酵温度：8 ~ 0℃。

【0 0 5 5】

本実施例の発酵性試験においては、表 6 及び図 6 に示した結果から明らかなように、馴養期間終了後の発酵速度はほぼ一定の値 (平均値約5.8%/24hr) となった。また、この場合も凝集性株の使用時に見られるバイオリアクター内での酵母の堆積は観察されなかった。

【0 0 5 6】

【表 6】

発酵回数(回)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値
エキス消費量 (%/24時間)	5.6	5.8	5.4	5.8	5.3	6.2	5.7	6.7	6.0	5.8

【0 0 5 7】

また、本実施例の浮遊酵母数試験においては、表 7 及び図 7 に示した結果から明らかなように、他の小スケールバイオリアクターを用いた実施例の場合に比べてやや低い1千万 ~ 2千万cells/ml (平均値約1千5百万cells/ml) の水準であ

ったが、80リットルスケールバイオリアクターにおいて凝集性株を使用した場合の一般的水準（3百万～1千万cells/ml）に比べて高い水準に安定的に保持することができた。

【0058】

【表7】

発酵回数(回)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値
浮遊酵母数 ($\times 10^6$ cells/ml)	14	17	17	21	13	10	11	11	18	14.6

【0059】

更に、本実施例のジアセチル生成量試験においては、表8及び図8に示した結果から明らかなように、主発酵終了時のジアセチル生成量が0.5～0.7ppm（平均値約5.8ppm）であった。

【0060】

【表8】

発酵回数(回)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値
DA含量 (ppm)	0.50	0.48	0.50	0.54	0.67	0.52	0.52	0.50	0.64	0.54

【0061】

バイオリアクターでの主発酵を終了したビールは、引き続き30リットルスケールで4週間の後発酵を行ない、その後に最終製品ビールについて低沸点揮発成分(L.V.C.)、ジアセチルの分析及び官能検査を行なった。なお、低沸点揮発成分の分析は島津製作所社製ガスクロマトグラフィーGC4Aにより行なった。

【0062】

表9に、9回目の主発酵により得られたビールを用いて得た最終製品ビールについての低沸点揮発成分及びジアセチルの分析結果を示す。表9に示した結果から明らかなように、本実施例で得られた最終製品ビールにおいては標準的なビールの分析値に比べて酢酸エステル量が高いのが特徴的であるが、バイオリアクタ

一発酵で特に問題となるジアセチル量は0.02ppmと官能的にも殆ど感じられないレベルまで還元され低下していた。

【0063】

また、本実施例で得られた最終製品ビールの試飲結果は、通常のビールと比較して大きな差異はなく、概ね良好であった。

【0064】

【表9】

分析結果(ppm)	アセトアルデヒド	アセトン	酢酸エチル	n-PrOH	i-BuOH	酢酸イソamil	i-AmOH	DA
リアクター発酵	4.3	0.1	36	14.6	12.7	2.0	56	0.02
ビール標準値	1.4	0.6	20	9.2	7.1	1.5	50	0.01

【0065】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の方法によれば、固定化微生物を利用したバイオリアクターによって発酵生産物を製造するにあたって、従来の認識に反して非凝集性の酵母を用いることにより、発酵過程における発酵速度を一定に保つと共に発酵終了時における浮遊酵母数をより高い水準に安定して維持することが可能となる。

【0066】

そして、特に麦芽アルコール飲料をバイオリアクターによって製造する場合に本発明の方法を採用すれば、発酵液並びに最終製品中のジアセチルの量を十分に低減する等して製品の香味を向上させることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明に好適な流動層型リアクターの一例の概略模式図を示す。

【図2】

継続発酵回数と浮遊酵母数との関係を示すグラフである。

【図3】

継続発酵回数とエキス消費量との関係を示すグラフである。

【図 4】

継続発酵回数と浮遊酵母数との関係を示すグラフである。

【図 5】

継続発酵回数とジアセチル量との関係を示すグラフである。

【図 6】

継続発酵回数とエキス消費量との関係を示すグラフである。

【図 7】

継続発酵回数と浮遊酵母数との関係を示すグラフである。

【図 8】

継続発酵回数とジアセチル量との関係を示すグラフである。

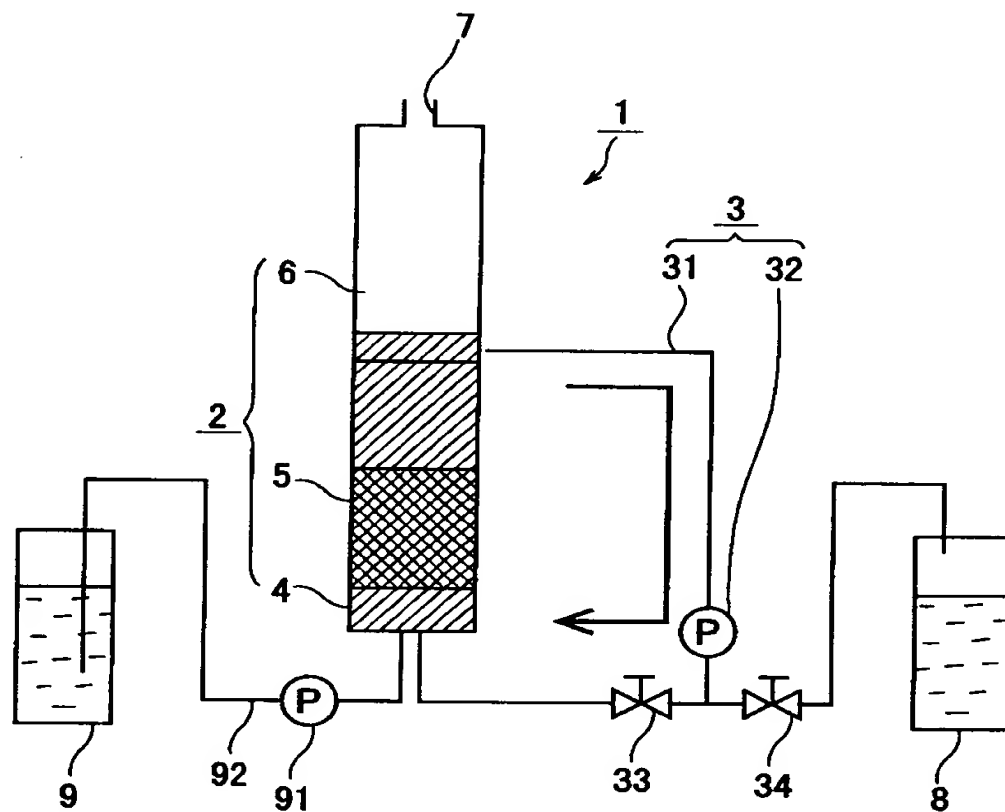
【符号の説明】

1 …流動層型リアクター、2 …反応タンク、3 …液循環部、4 …整流部、5 …流動層部、6 …空筒部、7 …ガス排出部、8 …生産物タンク、9 …原料液タンク、3 1 …配管、3 2 …ポンプ 3 2、3 3、3 4 …バルブ、9 1 …ポンプ、9 2 …配管。

【書類名】

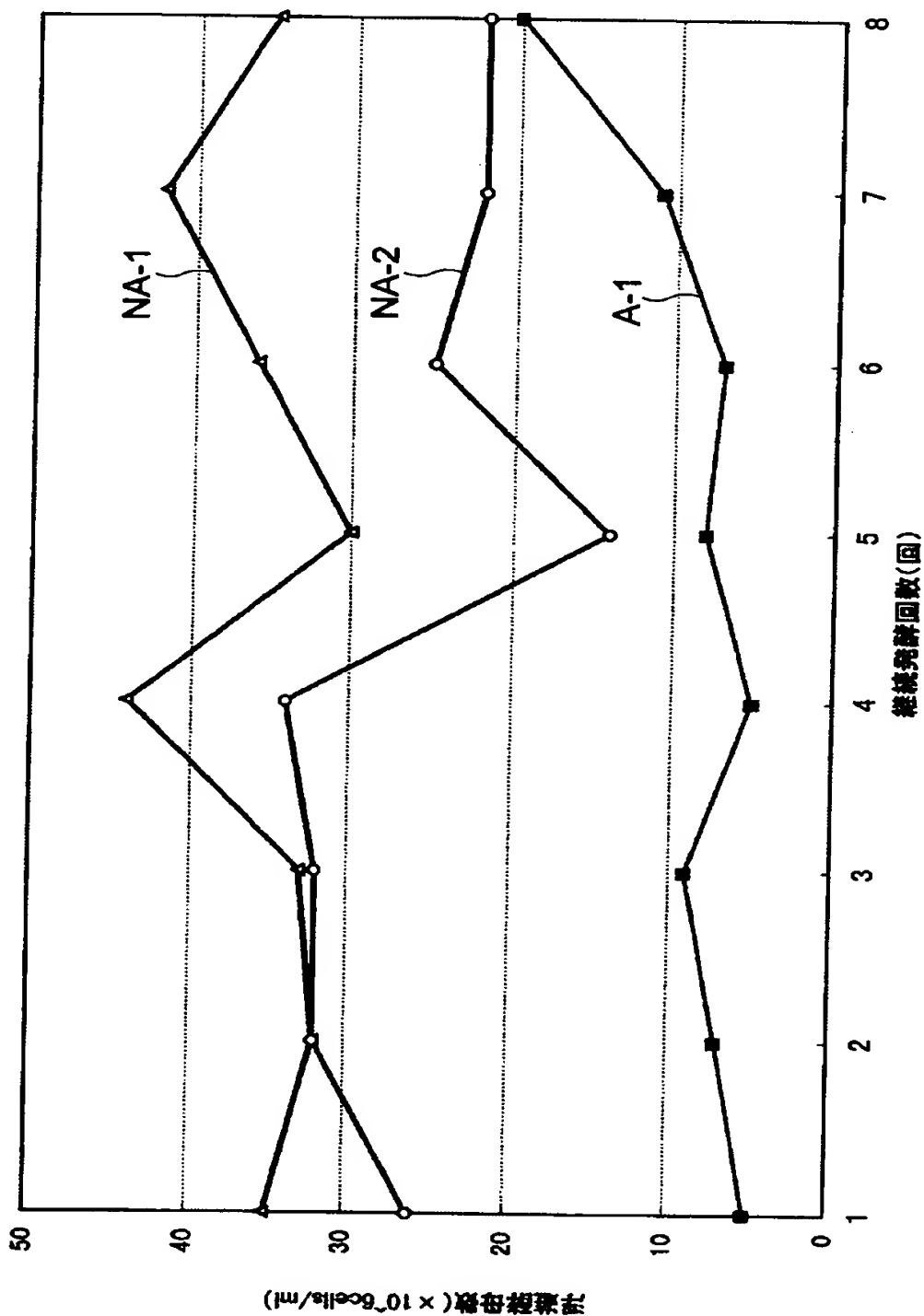
図面

【図 1】

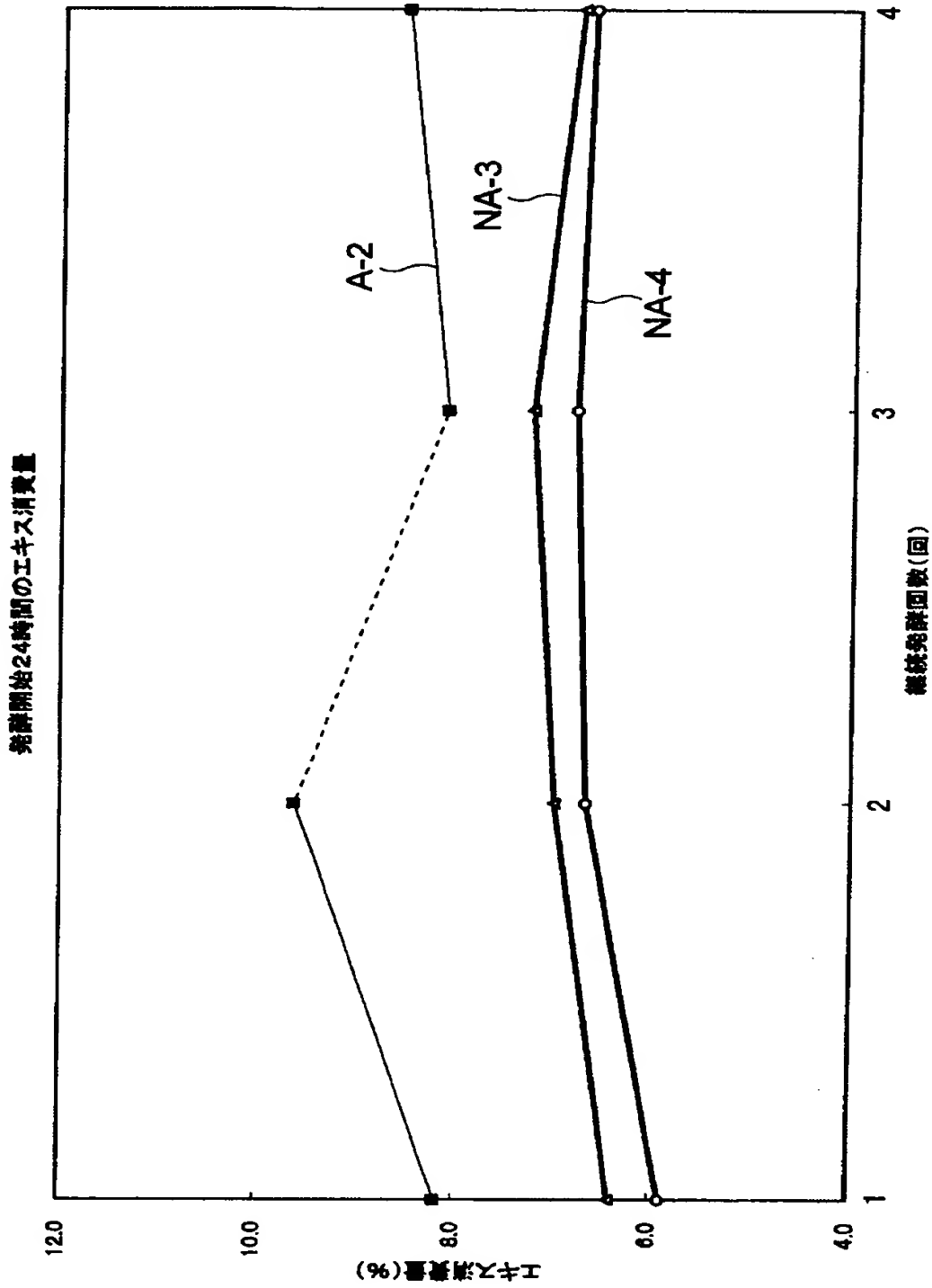


【図 2】

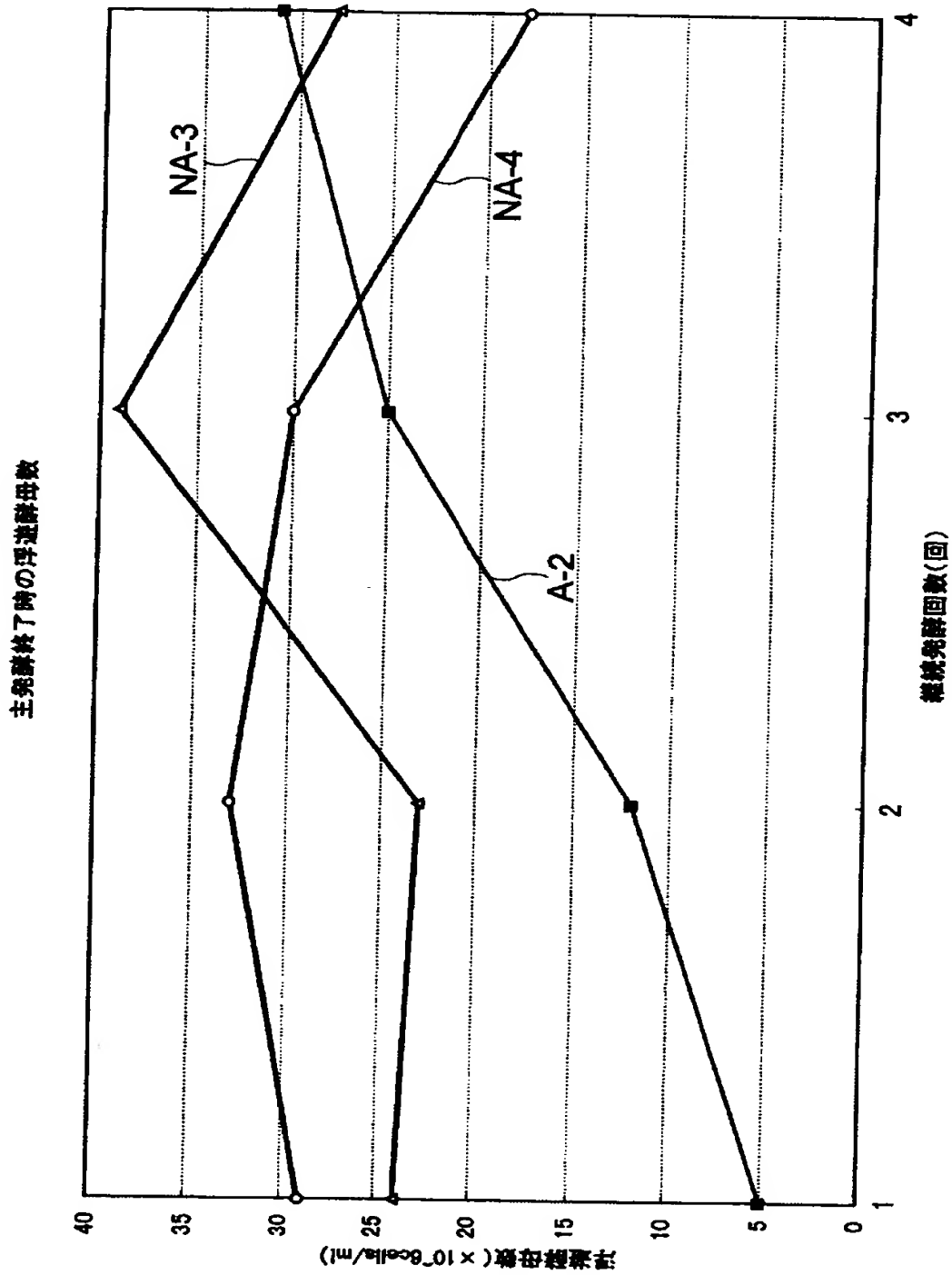
主発酵終了時の浮遊酵母数



【図 3】

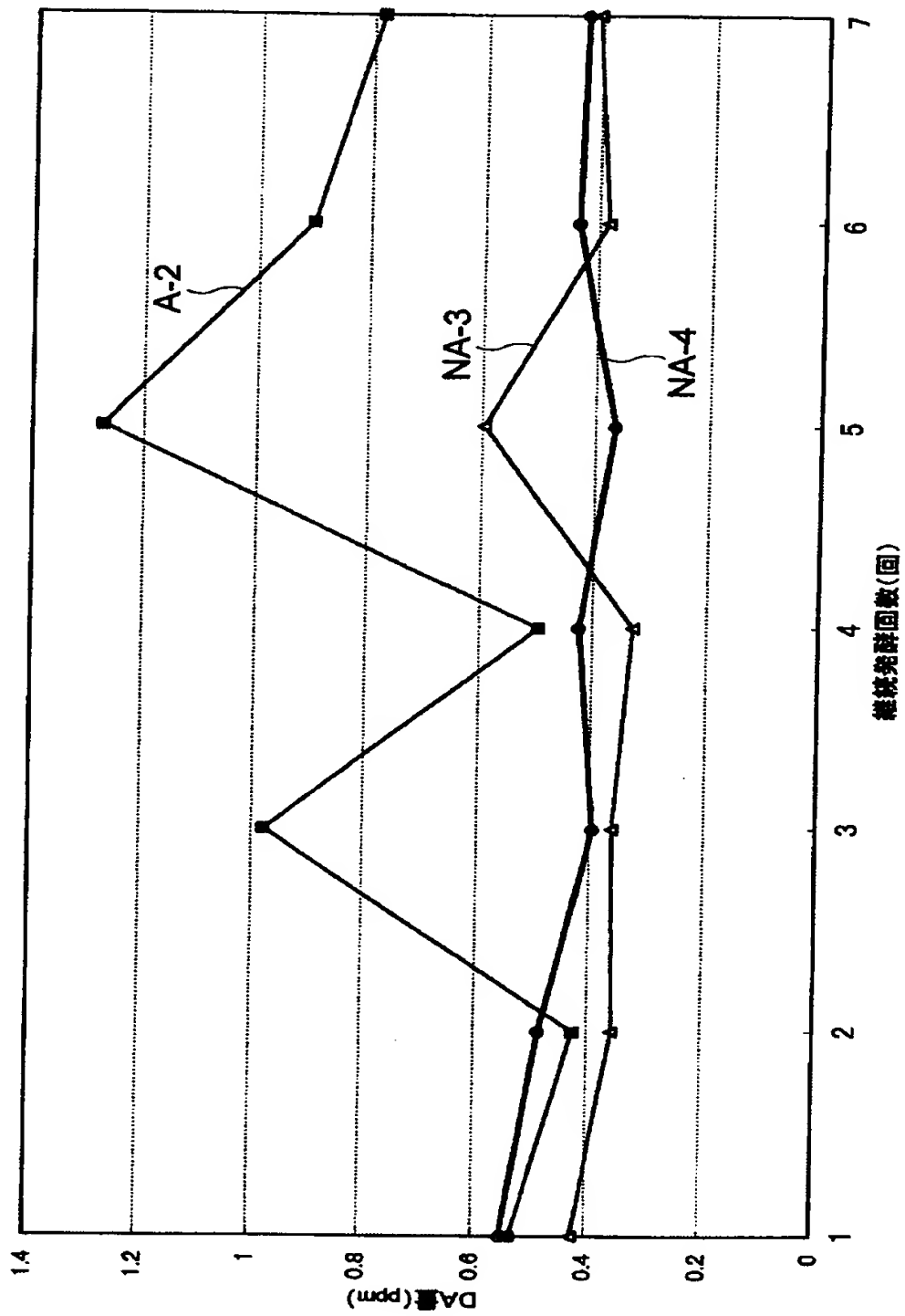


【図 4】



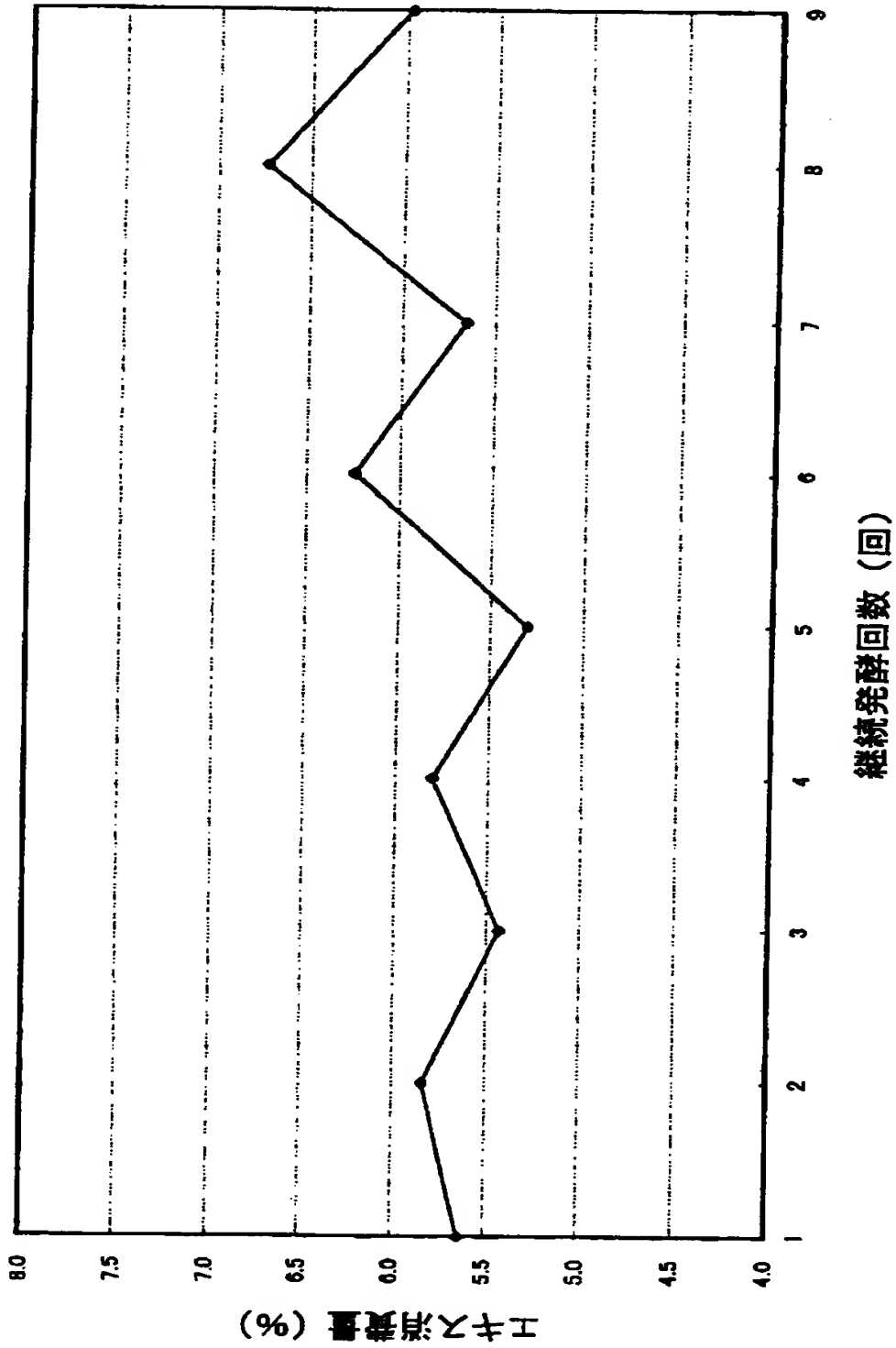
【図 5】

主発酵終了時DA生成量



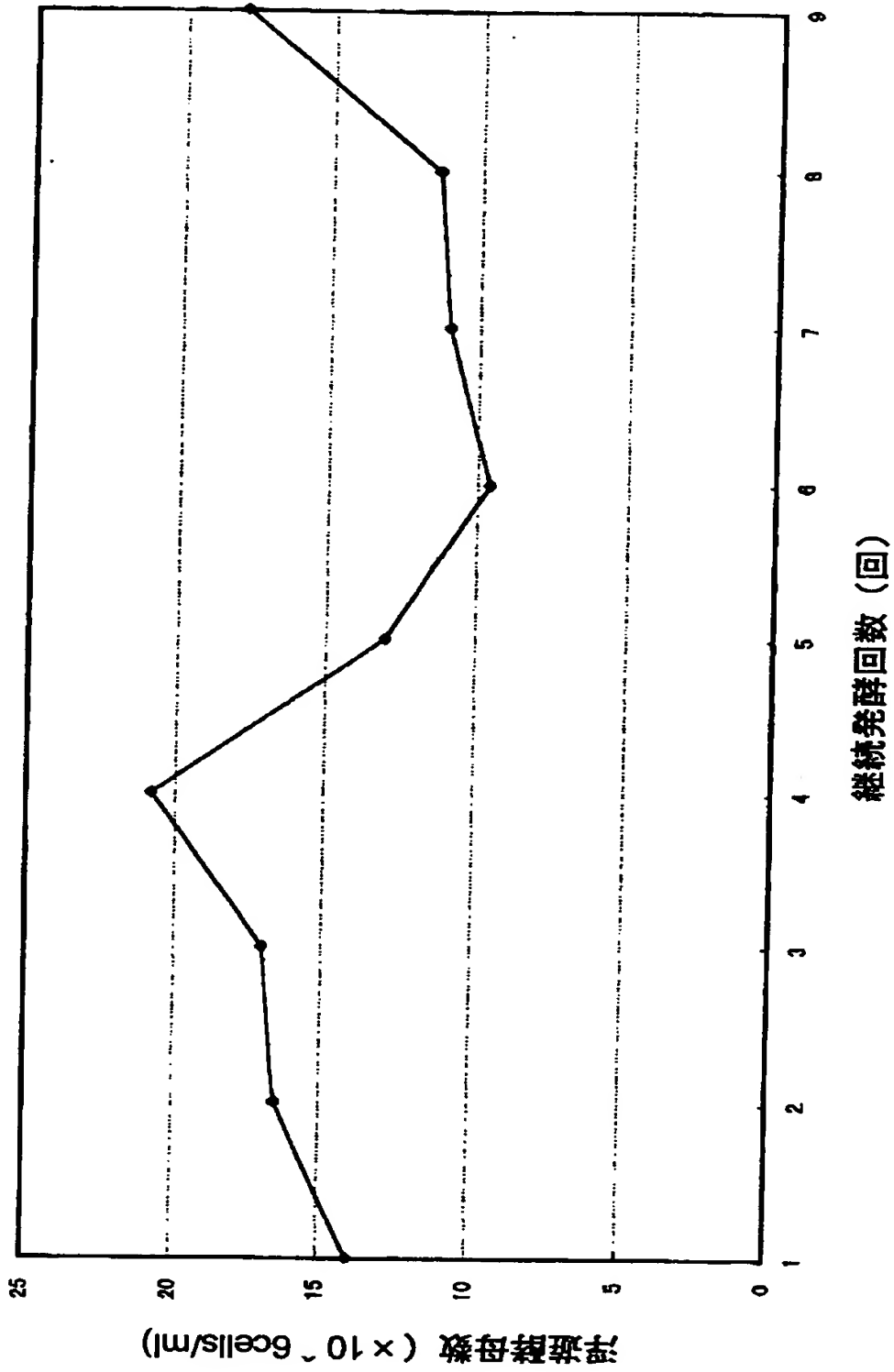
【図 6】

発酵開始24時間のエキスを消費量



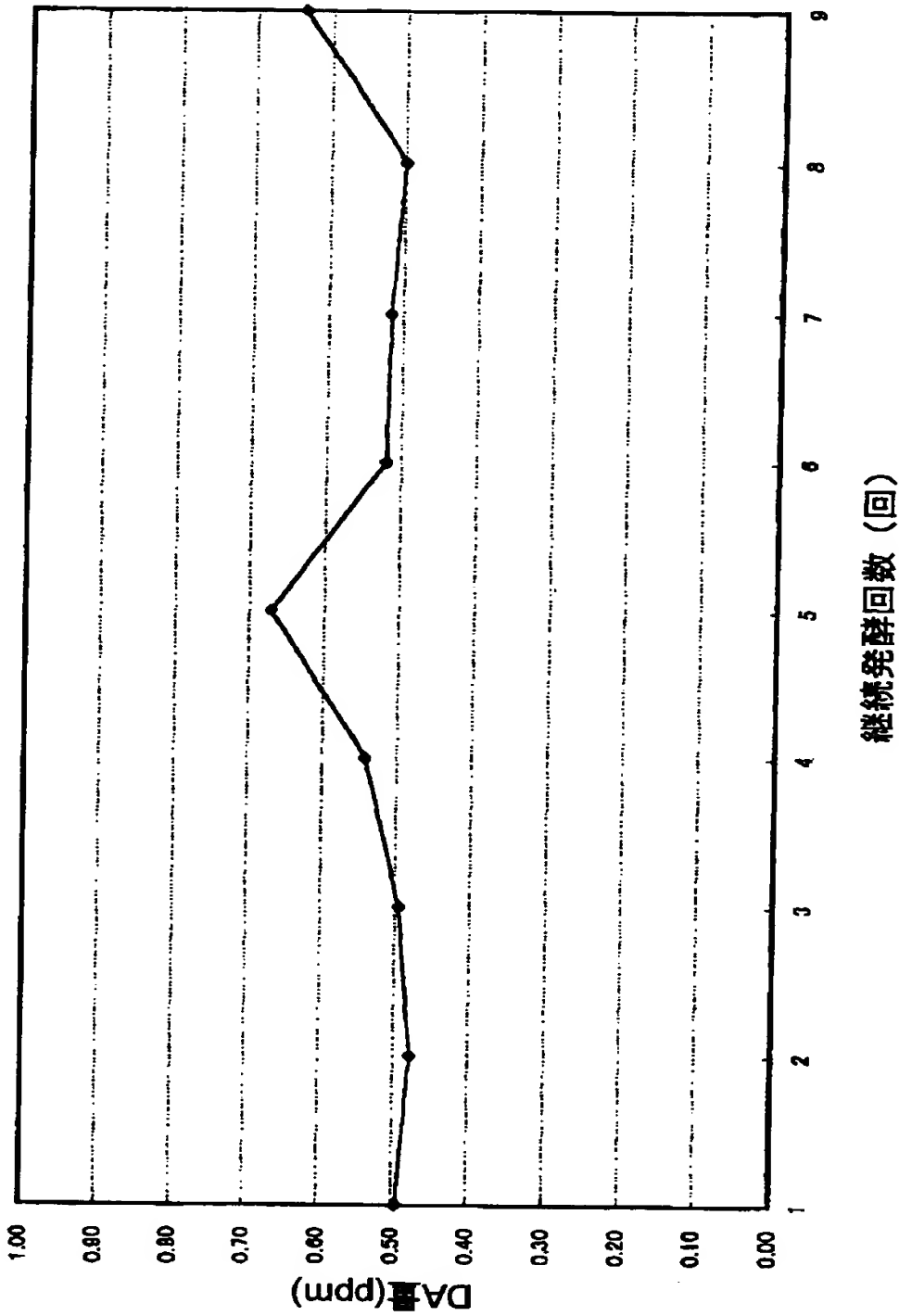
【図 7】

主発酵終了時の浮遊酵母数



【図 8】

主発酵終了時DA含有量



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 固定化微生物を利用したバイオリアクターによって発酵生産物を製造するにあたって、発酵過程における発酵速度を一定に保つと共に発酵終了時における浮遊酵母数をより高い水準に安定して維持することができ、特に麦芽アルコール飲料をバイオリアクターによって製造する場合には発酵液並びに最終製品中のジアセチルの量を十分に低減する等して製品の香味を向上させることが可能な方法を提供すること。

【解決手段】 固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法において、前記微生物として非凝集性酵母を用いることを特徴とする発酵生産物の製造法。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002196]

1. 変更年月日	1994年12月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号
氏 名	サッポロビール株式会社